

平成 22 年 5 月 19 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間： 2008～2009

課題番号： 20790618

研究課題名（和文） 抗アкваポリン4抗体陰性視神経脊髄炎における新規自己抗原の解析

研究課題名（英文） Analysis of new antigen in anti aquaporin-4 antibody-negative neuromyelitis optica

研究代表者

土井 光 (DOI HIKARU)

九州大学・大学病院・特任助教

研究者番号：30423552

研究成果の概要（和文）：

本研究は、抗AQP4抗体陰性の視神経脊髄炎における新規自己抗原の解析を目的に、その臨床病態およびT細胞系の検討を行ない、新たな特異的抗原の発見を目的とする。

我々は、神経系の主要な臨床症状である慢性頭痛について検討し、抗AQP4抗体陰性症例は、抗AQP4抗体陰性症例と比較し、前兆のある片頭痛が有意に少なく、臨床症状に差異があることを報告した。さらに補体系の検討では、抗AQP4抗体陽性症例及び抗AQP4抗体陰性症例との比較において、抗AQP4抗体陰性OSMSでは、抗AQP4抗体陽性症例ほど再発期の血清補体値上昇を認めないが、抗AQP4抗体陰性MSよりも上昇を認める症例が多く、両者の中間的な性格をもつことを明らかにした。

さらに、抗AQP4抗体陽性および陰性症例の末梢血単核球細胞および脳脊髄液を用い、スーパー抗原あるいはPMAおよびIonomycinで刺激し、IFN- γ 、IL-4、IL-9、IL-17をcytokine secretion assay法およびflow cytometry法を用いて分析し、各々の主要産生細胞であるヘルパーT1細胞、ヘルパーT2細胞、ヘルパーT9細胞、ヘルパーT17細胞のTh細胞動態測定した。現在までに、多発性硬化症患者1名において、MOG特異的反応性T細胞の増殖を確認している。さらに、細胞内サイトカイン測定法による測定、ケモカイン受容体の測定を行い、様々な角度からTh細胞の動態、すなわち抗原特異的T細胞の存在を検討中である。

以上、新規自己抗原の同定までは至っていないが、抗AQP4抗体陰性視神経脊髄炎では、補体系における病態は多発性硬化症および抗AQP4抗体陽性視神経脊髄炎の中間的な病態に位置しており、異なる一群である可能性を、本研究で示した。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study was to find new specific antigen in the central nervous system by researching clinical manifestation and analyzing T cell profile in patients with anti aquaporin-4 (AQP4) antibody-negative neuromyelitis optica (NMO).

We first researched the frequency of chronic headaches in patients with neuromyelitis optica and multiple sclerosis (MS). In the study, patients without anti AQP4 antibody had lower frequency of manifesting migraine with aura than patients with anti AQP4 antibody. We secondly researched system of complication. In patients with anti AQP4 antibody-negative optic-spinal MS showed intermediate level of CH50 compared with anti AQP4 antibody-positive NMO and anti AQP4 antibody-negative MS.

We further analyzed T helper 1, 17, 2, and 9 cell profile using fresh peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and cerebrospinal fluid (CSF) by measuring cytokine such as interferon-gamma, interleukin 17, interleukin 4, and interleukin 9 after the stimulation with PMA and ionomycin.

Preliminary results disclosed myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific, interferon-gamma producing cells (T helper 1) in a patient with MS. On the other hand, anti AQP4 antibody-negative NMO patients did not show any specific T helper cells so far. We now measuring chemokine receptors such as CXCR3, CCR6, CCR4, and CCR3 on T helper cells and cytokines mentioned.

In summary, we did not find new specific antigen in anti AQP4 antibody-negative NMO. But we showed that anti AQP4 antibody-negative NMO has different characteristics from anti AQP4 antibody-negative MS and anti AQP4 antibody-positive NMO.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：抗アクアポリン4抗体，多発性硬化症

1. 研究開始当初の背景

日本人の多発性硬化症（以下 MS）は、臨床的に異なる2つの病型が存在している。臨床症候からみた病巣が視神経と脊髄に限られる視神経脊髄型 MS (OSMS) と、それ以外の中枢神経系にも多巣性に病巣を有する通常型 MS (CMS) が混在しており、OSMS では 1) 女性の罹患率がより高い、2) 発症年齢が高い、3) 再発しやすい、4) 総合障害度が高い、5) 脳 MRI 上の病巣が少ない、6) 脊髄 MRI での異常信号域の長さが長く萎縮を呈しやすい、7) 髄液における細胞・蛋白の増加が高度、などの特徴を有している (Kira, Lancet Neurol, 2003)。MS における疾患感受性遺伝子もこれら2つの病型では異なっており、CMS では欧米白人と同様に *HLA-DRB1*1501* と正の相関があるのに対し、OSMS ではこの対立遺伝子との相関が認められず、*HLA-DPB1*0501* と正の相関にあることを本研究施設より報告している (Yamasaki et al, Brain, 1999)。病理学的には、CMS では脱髄が主体でありマクロファージや T 細胞の浸潤を病巣で認めるが、OSMS 病巣では軸索傷害や壊死など組織破壊が高度であり、マクロファージや T 細胞以外に好中球などの浸潤も認める点が特徴的である。このように、臨床的、遺伝学的、病理学的に異なる日本人 MS であるが、その病巣形成に関わるメカニズムは以前不明である。

現在、MS は髄鞘形成に関わるミエリン蛋白である、myelin basic protein (MBP)、myelin proteolipid protein (PLP)、myelin

oligodendrocyte glycoprotein (MOG)、oligodendrocyte specific protein (OSP) などに対する自己免疫応答が病態に関与すると考えられている。ウイルスや細菌に由来する外来蛋白に対する T 細胞エピトープとミエリンなどの自己蛋白との類似により、脳炎惹起性 T 細胞が誘導され発症するという、いわゆる分子相同性の仮説が提唱されている。当施設では、MBP、PLP、MOG のオーバーラッピングペプチドを作製し、OSMS、CMS 患者より抽出した末梢血単核球をこれらペプチドで刺激した場合、CMS では PLP に、OSMS では MOG に対するエピトープの拡大が強いことを報告している (Minohara et al, Tissue Antigens, 2001)。このような自己抗原に対する免疫応答の変化は、その抗原を T 細胞に提示しうる HLA 分子により規定されており、CMS と OSMS での疾患感受性を示す *HLA* クラス II 対立遺伝子の違いに起因するものと考えられる。

近年、欧米白人における Neuromyelitis optica (NMO) の患者血清中に、NMO-IgG 抗体なる自己抗体の存在が報告され (Lennon et al, Lancet, 2004)、後にこの抗体が、水チャンネルである Aquaporin-4 (AQP4) を認識することが示された (Lennon et al, J Exp Med, 2005)。この AQP4 抗体は、ウェスタンブロッティングでの denatured AQP4 蛋白には反応性を示さないが、HEK293 細胞に naïve AQP4 蛋白を発現させた場合には検出可能となる。

2. 研究の目的

当施設の研究グループではこの測定系を樹立し(図1)、日本人MS患者においての検討を行った結果、OSMSでは27.1%、CMSでは5.6%の陽生率であり、OSMSではCMSや他の神経疾患、健常者よりも有意に陽生率が高いことを見いだした(Matsuoka et al, Brain, 2007)。さらに、日本人MS患者を、AQP4抗体陽性群、AQP4抗体陰性OSMS群、AQP4抗体陰性CMS群の3つの群に分類し臨床パラメーターを比較した結果、AQP4抗体陽性群はAQP4抗体陰性OSMS群と比べより再発率が高く、抗SS-A抗体や抗SS-B抗体などの他の自己抗体陽生率が有意に高かった。AQP4抗体陰性CMS群との比較では、より重度の視神経炎や横断性脊髄炎を有する割合が有意に高率であった(表1)。抗AQP4抗体陽性群、抗AQP4抗体陰性OSMS群ともに高率にMRIで長大な脊髄病巣を認めるが、前者は胸髄上~中部の灰白質を侵すのに対し、後者は頸髄から胸髄にかけて軸位断では灰白質・白質ともにholocord patternで障害するという違いがある(図2)。つまり、日本人のMSには3つのグループが存在しており、一つは欧米白人のMSと同様なAQP4抗体陰性CMSグループであり、もう一つはNMOと考えられるAQP4抗体陽性グループ、そして最後にAQP4抗体陰性OSMSグループに分類されるものと考えられた。本研究でターゲットとしているAQP4抗体陰性OSMSグループは、CMSに比べ重度の視神経炎や横断性脊髄炎を有する割合が高く、より重篤な疾患群である。本研究では、第一に抗AQP4抗体陰性のOSMS患者における新規自己抗原の同定を目的としている。新規自己抗原を認識する自己抗体の検出には、抗AQP4抗体のようにdenatured蛋白には反応せず、conformation-sensitiveなエピトープを認識する自己抗体の検出とdenatured蛋白を認識する自己抗体の検出の2つの方法を用いる。第二の目的として、同定された新規自己抗原に対する細胞性免疫応答の検討、並びに臨床パラメーターやMRIなどの画像データとの関連を検討する。さらにその新規自己抗原を実験動物に免疫し、動物モデルを作製することを第三の目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、まず自己抗体の検出に関して2つの立場から検討を行う。1つめはconformation-sensitiveな自己抗体の検出、2つめはdenatured蛋白に対する自己抗体の検出を行う。これにより、候補となる自己抗原が同定された場合、その自己抗原に対する細胞性免疫応答の解析を行い、自己抗体陽生率と臨床パラメーター、MRIなどの画像所見との関連を詳細に検討する、さ

らに実験動物に免疫することにより動物モデルの作製を行う。Denatured蛋白に対する自己抗体のスクリーニング、Conformation-sensitiveな自己抗体のスクリーニング方法にて同定された新規自己抗原に対し、抗AQP4抗体陰性OSMS患者の細胞性免疫応答、並びに臨床パラメーターとの関連を検討、更に動物モデルの作製を行う。新規自己抗原のリコンビナント蛋白、オーバーラッピングペプチドの作製を施行し、新規自己抗原に対する細胞性免疫応答、液性免疫応答の検討を行う。上記、細胞性免疫応答や自己抗体陽生率などのデータと、臨床パラメーター(重症度、発症年齢、横断性脊髄炎の割合、重度の視神経障害の有無など)やMRIなどの画像所見(頭蓋内病変、3椎体以上の長い脊髄病変の有無など)との関連について詳細に検討する。

4. 研究成果

我々は、神経系の主要な臨床症状である慢性頭痛について検討し、抗AQP4抗体陰性症例は、抗AQP4抗体陰性症例と比較し、前兆のある片頭痛が有意に少なく、臨床症状に差異があることを報告した。さらに補体系の検討では、抗AQP4抗体陽性症例及び抗AQP4抗体陰性症例との比較において、抗AQP4抗体陰性OSMSでは、抗AQP4抗体陽性症例ほど再発期の血清補体値上昇を認めないが、抗AQP4抗体陰性MSよりも上昇を認める症例が多く、両者の中間的な性格をもつことを報告した。以上より、抗AQP4抗体陰性NMOは、臨床面で抗AQP4抗体陰性MSおよび抗AQP4抗体陽性NMOとは異なる一群である可能性を見出した。

さらに我々は、抗AQP4抗体陽性および陰性症例の末梢血単核球細胞および脳脊髄液を用い、PMAおよびIonomycinで刺激し、サイトカインであるIFN- γ 、IL-4、IL-17、IL-9を、ケモカイン受容体であるCXCR3、CCR6、CCR4、CCR3をcytokine secretion assay法およびflow cytometry法を用いて分析し、各々の主要産生細胞であるヘルパーT1細胞、ヘルパーT2細胞、ヘルパーT17細胞のTh細胞動態を確認中である。現在までに、多発性硬化症患者1名において、MOG特異的反応性T細胞の増殖を確認しているが、抗AQP4抗体陰性NMOにおける患者群での新規自己抗原発現には至っていない。現在も本実験は継続中であり、今後の結果に期待する状況である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者

には下線)

〔雑誌論文〕(計5件)

Reappraisal of brain MRI features in patients with multiple sclerosis and neuromyelitis optica according to anti-aquaporin-4 antibody status

Matsushita T, Isobe N, Piao H, Matsuoka T, Ishizu T, Doi H, Masaki K, Yoshiura T, Yamasaki R, Ohyagi Y, Kira J. J Neurol Sci. 2010; 291: 37-43.

Frequency of chronic headaches in Japanese patients with multiple sclerosis.

Doi H, Matsushita T, Isobe N, Ishizu T, Ohyagi Y, Kira J. Headache 2009; 49: 1513-1520

Multimodality evoked potential study of anti-aquaporin-4 antibody-positive and -negative multiple sclerosis patients

Watanabe A, Matsushita T, Doi H, Matsuoka T, Shigeto H, Isobe N, Kawano Y, Tobimatsu S, Kira J. J Neurol Sci 2009; 281: 34-40

Hypercomplementemia at relapse in patients with anti-aquaporin4 antibody

Doi H, Matsushita T, Isobe N, Matsuoka T, Minohara M, Ochi H, Kira J. Mult Scler 2009; 15: 304-310

Hypercomplementemia at relapse in patients with anti-aquaporin4 antibody

Doi H, Matsushita T, Isobe N, Matsuoka T, Minohara M, Ochi H, Kira J. Neurology Asia 2008; 13: 227-229

〔学会発表〕(計7件)

多発性硬化症患者へのインターフェロンβ導入による脳脊髄液中サイトカインへの影響．土井光，松下拓也，立石貴久，磯部紀

子，吉良潤一．第22回日本神経免疫学会総会(2010年3月17, 18, 19日)

慢性頭痛を伴う多発性硬化症患者の脳脊髄液中サイトカイン分析 土井光 松下拓也，立石貴久，磯部紀子，大八木保政，吉良潤一．第37回日本頭痛学会総会(2009年11月28, 29日)

抗アクアポリン4抗体陽性症例の再発期における高補体血症の存在．土井光，松下拓也，磯部紀子，松岡健，三野原元澄，越智博文，吉良潤一．第50回日本神経学会総会(2009年5月20, 21, 22日)

多発性硬化症および高アクアポリン4抗体陽性症例における補体系の検討．土井光，松下拓也，磯部紀子，松岡健，三野原元澄，越智博文，吉良潤一．第21回日本神経免疫学会学術集会(2009年3月12, 13日)

Hypercomplementemia at relapse in patients with anti-aquaporin-4 antibody

Doi H, Matsushita T, Isobe N, Matsuoka T, Minohara M, Ochi H, Kira J. First congress of the Pan-Asian committee for treatment and research in multiple sclerosis (Nov 21-22, 2008, Kuala Lumpur, Malaysia)

日本人多発性硬化症患者における慢性頭痛罹患率の検討 土井光 松下拓也 松岡健，三野原元澄，吉良潤一．第36回日本頭痛学会総会(2008年11月14-15日)

多発性硬化症における慢性頭痛の罹患率およびその病態の検討．土井光 松岡健 松下拓也 越智博文 三野原元澄 大八木保政 吉良潤一．第49回日本神経学会総会

(2008年5月15日)

〔図書〕(計1件)

神経救急 - 見落とされがちな神経疾患を中心に E. 中枢神経系の救急 22. 多発性硬化症 . 土井光, 吉良潤一 . Clinical Neuroscience 2009 ; 27 巻 8 号 : 931-933

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計0件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土井光 (大学病院) 特任助教

研究者番号 : 30423552

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし